

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické a jaderné chemie

VLIV KYSELINY SALICYLOVÉ NA FYTOEXTRAKCI NAPROXENU A DIKLOFENAKU

INFLUENCE OF SALICYLIC ACID ON NAPROXENE AND DICLOFENAC
PHYTOEXTRACTION

Bakalářská práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Martina Vrtalová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. Ing. Stanislava Smrčka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 30. srpna 2010.

.....
podpis

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Poděkování

Velice děkuji vedoucímu bakalářské práce Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, všestrannou pomoc a čas, který mi věnoval. Paní Ing. Šárce Pšondrové za pomoc, ochotu a vstřícnost při řešení experimentální části této práce, skvělou atmosféru a prostředí, které vytváří.

Děkuji rodičům za veškerou podporu, důvěru a zázemí, které mi ke studiu poskytli.

Seznam zkratk a symbolů

ACN (acetonitril)

cAMP (cyklický adenosinmonofosfát)

COX (enzym cyklooxygenasa)

CNS (centrální nervový systém)

ČOV (čistírna odpadních vod)

DMSO (dimethylsulfoxid)

EDCs (látky narušující endokrinní systém)

GC (plynová chromatografie)

GIT (gastrointestinální trakt)

HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

LC MS/MS (kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí)

MeOH (methanol)

MNA (přirozené snižování kontaminace procesy probíhajícími v přírodě)

MS médium (médium podle Murashiga a Skooga)

NSPZL (nesteroidní protizánětlivé látky)

PAH (polycyklické aromatické uhlovodíky)

PCB (polychlorované aromatické uhlovodíky)

PPCPs (farmaka a produkty osobní péče)

TCE (chlorované alifatické uhlovodíky)

TPH (ropné uhlovodíky)

VOCs (těkavé organické látky)

Abstrakt

V rámci studia fytoextrakce residui farmak v ekosystému byl studován vliv kyseliny salicylové na fytoextrakci naproxenu a diklofenaku. Experimenty byly provedeny pomocí sterilní *in vitro* kultivace rostlinných druhů *Helianthus annuus*, *Pisum sativum*, *Brassica napus* a *Zea mays* na mediu dle Murashiga a Skooga, doplněném o příslušné kombinace testovaných substancí. Extrakce naproxenu (15 a 17 mg/l) v přítomnosti kyseliny salicylové (1 a 5 mg/l) se snížila u rostlin *B. napus* and *P. sativum*. Naopak u *H. annuus* byla fytoextrakce naproxenu za stejných experimentálních podmínek zvýšena. U kombinace diklofenak/kyselina salicylová byl nalezen pozitivní vliv na extrakci diklofenaku u *H. annuus* při koncentraci kyseliny salicylové 1 mg/l, v případě koncentrace kyseliny salicylové 5 mg/l byla fytoextrakce snížena. U ostatních použitých rostlinných druhů došlo ke koncentračně závislému snížení fytoextrakce vlivem přidané kyseliny salicylové. Získané výsledky prokázaly, že fytoextrakce vícekomponentní směsi polutantů je složitý proces a salicylová kyselina ovlivňuje fytoextrakci diklofenaku v pozitivním i negativním smyslu, v závislosti na její koncentraci a použitém rostlinném druhu.

Klíčová slova

Fytoremediace, fytoextrakce, naproxen, diklofenak, kyselina salicylová..

Abstract

The influence of salicylic acid on the naproxene and diclofenac phytoextraction at different starting concentrations of tested substances has been investigated. The experiments were performed using *in vitro* sterile hydroponic cultivation of *Helianthus annuus*, *Pisum sativum*, *Brassica napus* and *Zea mays* plants on the Murashige-Skoog cultivation medium supplemented with appropriate combinations of tested substances. The extraction of naproxene (15 or 17 mg/l) in the presence of salicylic acid (1 or 5 mg/l) was decreased at *B. napus* and *P. sativum* plants. In contrast to these results the phytoextraction by *H. annuus* plants was increased by the use of the same experimental conditions. At diclofenac/salicylic acid combinations and *H. annuus* plants the positive influence of salicylic acid in the concentration of 1 mg/l on diclofenac phytoextraction was found while the concentration of 5 mg/l diminished the phytoextraction efficiency. At other used plant species the extraction of diclofenac was concentration dependently decreased by salicylic acid. The obtained results clearly show that phytoextraction in multicomponent mixtures is complicated and in tested systems the salicylic acid moderately influenced phytoextraction of naproxene and diclofenac in dependence on the used plant species and salicylic acid concentrations.

Keywords

Phytoremediation, phytoextraction, naproxen, diclofenac, salicylic acid.

Obsah

1	Úvod.....	- 9 -
2	Přehled a rozbor literatury.....	- 12 -
2.1	Zdroje léčiv v životním prostředí.....	- 12 -
2.2	Výskyt léčiv v životním prostředí.....	- 13 -
2.3	Osud léčiv v životním prostředí.....	- 15 -
2.4	Účinky směsí léčiv	- 16 -
2.5	Fytoremediační techniky.....	- 17 -
2.5.1	Fytoremediace organických látek	- 17 -
2.5.2	Fytoremediace těžkých kovů	- 18 -
2.5.3	Hyperakumulátory a transgenní rostliny.....	- 18 -
2.5.4	Rozdělení fytoremediačních technik	- 19 -
2.5.4.1	Fytoextrakce (fytoakumulace)	- 19 -
2.5.4.2	Fytodegradace	- 19 -
2.5.4.3	Fytovolatilizace.....	- 20 -
2.5.4.4	Fytostabilizace	- 20 -
2.5.4.5	Rhizodegradace.....	- 20 -
2.5.4.6	Rhizofiltrace.....	- 21 -
2.5.5	Výhody a nevýhody fytoremediace	- 21 -
2.6	Nesteroidní protizánětlivé látky (NSPZL).....	- 22 -
2.6.1	Kyselina salicylová	- 23 -
2.6.2	Naproxen.....	- 24 -
2.6.3	Diklofenak	- 25 -
2.7	Cíl práce	- 27 -
3	Experimentální část.....	- 28 -
3.1	Chemikálie	- 28 -
3.2	Přístroje	- 28 -
3.3	Rostlinný materiál.....	- 28 -
3.4	Pracovní postup.....	- 29 -
3.4.1	Příprava rostlinných kultur	- 29 -
3.4.2	Fytoextrakce.....	- 29 -
4	Výsledky a diskuse.....	- 31 -

4.1	Naproxen.....	- 32 -
4.2	Diklofenak	- 35 -
5	Závěr	- 38 -
	Soupis bibliografických citací	- 39 -

1 Úvod

S rozvojem životního komfortu, hygienických standardů a lékařských chemoterapeutických metod došlo v posledních několika desítkách let k nárůstu kontaminace v životním prostředí produkty spotřební chemie a farmaceutickými substancemi. Díky souběžnému rozvoji v technologii čištění odpadních vod se podařilo snížit kontaminaci čistírenských výpusť nespecifickým organickým znečištěním [1]. Mnohé sloučeniny však odolávají i moderním čistírenským technologiím a jsou vypouštěny ve větší či menší míře do povrchových vod. K nim právě patří řada farmak a jejich metabolity tvořící se v lidském organismu. První zmínky o výskytu léčiv jako kontaminantů životního prostředí pochází z roku 1970 z USA a 1980 z Anglie. Práce zahrnovaly informace o vypouštění léčiv z čistíren odpadních vod a o jejich vlivu na organismy vystavené jejich působení [2]. Ročně se vyrábějí stovky tun léčiv pro humánní nebo veterinární použití. V roce 1999 Daughton a Ternes definovali nový pojem pro specifické polutanty, dostávající se do odpadních vod po použití obyvatelstvem, jako PPCPs (Pharmaceutical and Personal Care Products). Tato skupina zahrnuje převážně kosmetické a hygienické přípravky a léčiva včetně jejich polárních metabolitů či metabolických konjugátů, mnohdy postupně štěpených na původní formu. Spotřebu léčiv nelze prakticky omezit ani regulovat a po terapeutickém použití končí v důsledku preferované renální exkrece v odpadních vodách [1]. Značná část z nich se pak dostává do povrchové vody, a tak různými cestami kontaminují životní prostředí. Současné používané postupy čištění a úpravy odpadní vody nejsou schopny zajistit úplné odstranění mnohých léčiv. Byl prokázán výskyt stovek účinných přípravků v povrchových, odpadních i podzemních vodách, nově se také začíná sledovat jejich výskyt v pitné vodě. Účinné látky jsou cíleně syntetizovány, aby odolávaly inaktivaci před dosažením cílového účinku. Tato přednost paradoxně snižuje jejich biologický rozklad a má za následek bioakumulaci a toxické účinky v ekosystémech. Farmaceutické substance, i v případě částečné rozložitelnosti v ekosystému, kontinuálně vstupují do životního prostředí a jsou proto chápány jako perzistentní polutanty, byť se vyskytují v přírodě ve velmi nízkých koncentracích. Nepříznivý vliv subterapeutických koncentrací podávaných nepřetržitě v průběhu celého životního cyklu byl prokázán u vodních obratlovců i bezobratlých. Nejzávažnější jsou účinky projevující se po předchozí kumulaci až v následujících generacích. Tyto a další provedené studie

prokázaly, že léčiva vyskytující se v životním prostředí mohou negativně působit jak na lidské zdraví, tak na ostatní necílové skupiny organismů. Nově vyráběná léčiva jsou vlivem vzniklých legislativních kroků v USA a EU testována, zda ovlivňují ekosystém. Důsledkem jsou nově zaváděné metody hodnocení akutní a chronické toxicity. Stále však trvá výrazný nedostatek toxikologických informací o účincích léků, obzvláště pak synergicky interagujících směsí [3,4].

Ke zjišťování obsahu léčiv ve vodním prostředí se nejčastěji využívají separační metody s vysoce citlivými detektory, kde detekční limity jsou v řádu ng/l. Často používanou metodou je GC metoda s hmotnostně spektrometrickou detekcí, která většinou vyžaduje derivatizaci vzorku. Vysoké ekonomické nároky na přístrojové vybavení LC MS/MS metod, jsou hlavním limitujícím faktorem v jejich použití, ale poskytují vyšší citlivost a širší spektrum detekovatelných léčiv.

Výskyt nebo případná absence léčiv v testované vodě je odrazem detekčních schopností použitých metod. Vymizení účinné látky neznamena její degradaci na CO₂, ale mnohdy vznik dalších toxičtějších nebo biologicky účinnějších látek, což vyvíjí tlak na rozšiřování a zdokonalování separačních metod s paralelním zařazením detekčních analytických metod zároveň využívaných v čistírnách odpadních vod [2]. Běžné zařazovanými technologiemi v čistírnách odpadních vod jsou aktivační procesy ve vznosu s možností až 90% účinnosti eliminace běžných léčiv. Nezachytí se karbamazepin, kyselina klofibrová, diklofenak a ibuprofen. Speciálním typem s vyšší účinností jsou membránové reaktory a extenzivní systémy využívající kořenové čištění nebo mokřady se sezónní dynamikou eliminace. Nové procesy odstraňování léčiv při dočišťování jako jsou například desinfekce UV zářením, aplikace práškového aktivního uhlí, FeCl₃ či ozonizace se zatím nevyskytují v rutinním použití [1].

Díky vysokému nárůstu lidské populace a zničujícímu působení zemědělských systémů na životní prostředí, je zřejmé, že dosavadní výměry zemědělské plochy nebudou stačit i přes použití geneticky modifikovaných odrůd rostlin nebo odrůd s vysokou produkcí. Vyčištěním rozsáhlých kontaminovaných oblastí lze snížit narůstající expanzi zemědělských monokultur do volné přírody, deštných pralesů a okrajových málo úrodných ploch, což umožní zachování biologické diverzity a záchranu životně důležitých ekosystémů [5]. Globální udržitelnost vodního hospodářství je dána schopností opětovného využití komunálních odpadních vod pro

zavlažování a jako zdroj pitné vody. Zprávy o obsahu léčiv a hormonů v odpadní, či v povrchové vodě vedly k znepokojení veřejnosti s odmítavým postojem vůči metodám založených na jejím opětovném využití [2].

Nejužívanějšími léky v České republice jsou analgetika, neboť bolest je nejčastějším příznakem přivádějícím pacienta k lékaři. Vysoká spotřeba je do značné míry ovlivněna i prodejem přípravků bez lékařského předpisu [4].

2 Přehled a rozbor literatury

2.1 Zdroje léčiv v životním prostředí

Největší rozvoj chemických léčiv proběhl po druhé světové válce, kdy se léky začaly vyrábět průmyslově a zvýšení spotřeby se odráží i na jejich výskytu v životním prostředí [6].

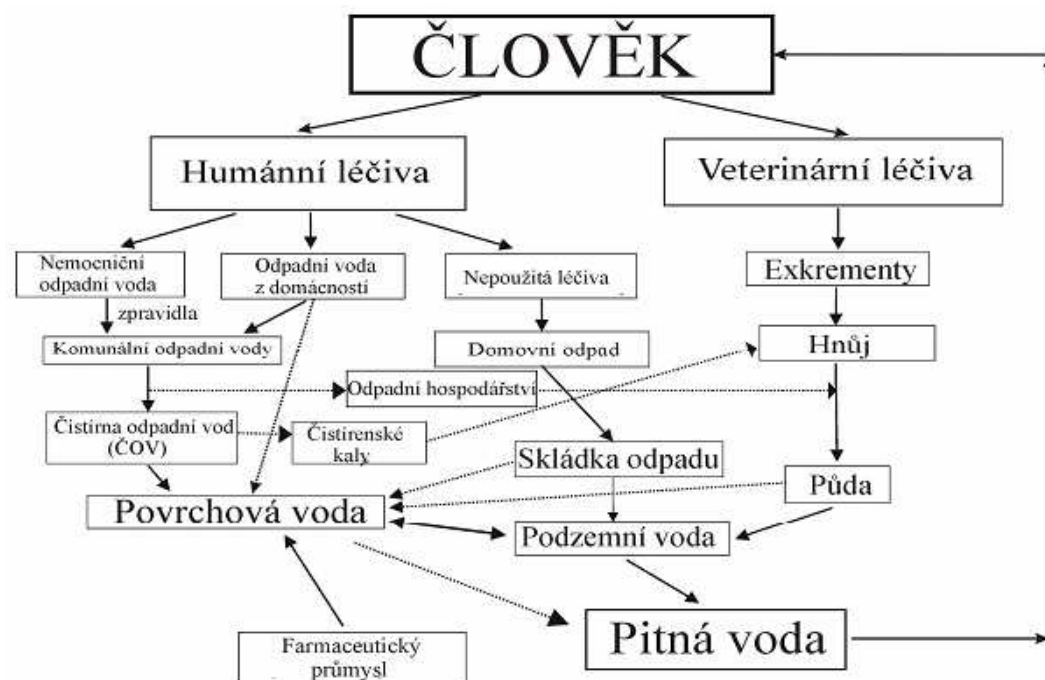
Za největší zdroj znečištění farmaky je považována odpadní voda z městských ČOV, kam se léky a jejich metabolity dostávají po spotřebování a následném vyloučení formou moči nebo výkalů.

Ke kontaminaci životního prostředí přispívá i nesprávná likvidace nespotřebovaných medikamentů a léků, s uplynulou dobou spotřeby, s pevným domácím odpadem nebo splachováním do odpadu. To následně způsobuje, že se účinné látky rozšiřují průsaky ze skládek, případně vstupují do komunálních odpadních vod [1].

Farmaceutické firmy produkují rovněž odpadní vodu s vysokým obsahem léčiv. Přestože každý závod má vlastní ČOV, nikdy nedochází k úplné eliminaci. Zvláštním zdrojem kontaminace je také odpadní voda z ilegálních varen při výrobě drog z lékových preparátů.

Zanedbat nelze ani použití diagnostických sloučenin a X-ray kontrastních látek, které jsou aplikovány v nemocničních zařízeních a jsou vylučovány v nezměněné podobě [1,6].

Důsledkem nedostatečného odstranění léčiv z odpadní vody dochází ke kontaminaci povrchové vody a tím k působení na říční biocenózu. Z tohoto důvodu nelze vyloučit znečištění podzemní nebo pitné vody, čímž dochází k uzavření koloběhu těchto látek v životním prostředí (Schéma 2.1.1). Při použití čistírenských kalů, či exkrementů živočichů k zvyšování úrodnosti zemědělských ploch, pronikají rezidua humánních i veterinárních farmak do potravních řetězců [1,4].



Obr. 2.1.1 Schéma koloběhu léčiv v životním prostředí [4].

2.2 Výskyt léčiv v životním prostředí

Výskyt farmak v životním prostředí je významně závislý na zkoumaném regionu. Rozdíly jsou jak v množství spotřebovaných léčiv na osobu, ve výskytu nemocí, či oblibě určitých medikamentů v populaci a u lékařů, tak i v technologickém zpracování v ČOV, což se odráží i v rozdílném výskytu farmak v povrchových, případně podzemních vodách [1,6].

Z důvodu neúplné eliminace, při odstraňování PPCPs a EDCs (Endocrine Disrupting Compounds) a jejich metabolitů, bývají zpravidla povrchové vody nejexponovanějšími částmi životního prostředí. Týká se to zejména středních a dolních toků řek, na kterých jsou vystavěny velké aglomerace a tím i mnoho ČOV. Výskyt jednotlivých xenobiotik se liší v závislosti na mnoha okolnostech, proto je lze detekovat v různých koncentracích téměř po celém světě. Nejčastěji jsou nalezena rezidua farmak jako například nesteroidní protizánětlivé látky (diklofenak, ibuprofen, kyselina salicylová), antibiotika (erythromycin, ofloxacin, chlortetracyklin), steroidy a pohlavní hormony (17- β -estradiol, estron, 17- α -ethynylestradiol), antiepileptika (karbamazepin), hypolipidemika (kyselin klobifrová, gemfibrozil, benzaifibrát) a β -blokátory (metoprolol, propranolol, nadolol) [6,7].

Většina případů nalezených léčiv při měření vzorků podzemních vod pochází z blízkých skládek nebo dalších bodových zdrojů, např. průsaky z kanalizace a ČOV. Nelze z nich tedy vyvozovat žádné závěry o globálním stavu znečištění. Nízká kontaminace podzemních vod je dána jejich dobrou izolovaností geologickými vrstvami s malou propustností a dobrou sorpční schopností zemin, kterými podzemní voda proudí. Přesto v nich byly nalezeny látky (diklofenak, kyselina klofibrová), které neměly zjevný vztah k lokálnímu zdroji [6].

Byla provedena řada studií, při nichž byl prokázán výskyt léčiv i jejich transformovaných produktů v surové, ale i upravené pitné vodě. Při úpravě pitné vody dochází k odstranění značné části farmak obsažených v použitém zdroji. Přesto v upravené pitné vodě v USA byla detekována odolná rezidua: karbamazepin (5,4-18 ng/l), atenolol (2,8-26 ng/l), sulfamethoxazol a gemfibrozil (1-3 ng/l) [2,9]. V Berlínské pitné vodě byl nalezen metabolit dimethylaminophenazonu, v koncentraci 0,9 µg/l. Tato zjištění vyvolávají řadu otázek ohledně kvality vody konzumované lidskou společností a jejího možného vlivu na zdravotní stav populace [8].

Významným prvkem při rozšiřování léčiv do půdy je aplikace stabilizovaných čistírenských kalů. Vlastnosti jednotlivých látek umožňují sorpci na půdní částice nebo rozšiřování do okolí závlahovou vodou či srážkami. Sorbovaná farmaka na půdních částicích mohou podléhat degradaci půdními bakteriemi. To je patrné na příkladu z německého Braunschweigu, kde k zavlažování a hnojení využívali vodu a čistírenské kaly po dobu 45 let. Analýzou vody prosakující z pole bylo zjištěno, že více než 80 % látek bylo rozloženo [6].

V ČR je nalezený obsah farmakologicky účinných látek nižší než v ostatních státech EU. Prozatím provedené studie udávají přítomnost estrogenů. Největší koncentrace 345 ng/l byla nalezena u výtoku z místní ČOV v Uhřetěvsi [6]. Diklofenak, ibuprofen, karbamazepin, různá antibiotika, a regulátory lipidů byly v rozmezí 20-140 ng/l zjištěny v řece Labe [7]. Kontaminace vybranými analgetiky v roce 2010 v řece Dřevnici je uvedena v Tab.2.2.1.

Tab. 2.2:1 Hodnoty farmak naproxenu a diklofenaku, naměřené 2.3.2010 v řece Dřevnici, ČR [4].

místo odběru	řeka	naproxen [ng/l]	diklofenak [ng/l]
Zlín-Malenovice (před ČOV)	Dřevnice	21,75	28,49
Zlín-Malenovice (výpusť z ČOV)	Dřevnice	190,53	403,12
Zlín-Malenovice (za ČOV)	Dřevnice	152,21	172,51
Slušovice (pod přehradou)	Dřevnice	6,90	8,62

2.3 Osud léčiv v životním prostředí

Detekce léčiv v životním prostředí je jasným signálem, že doposud využívané metody při čištění odpadních vod v ČOV a úpravě vody ze zdrojů, pitné vody, nejsou efektivní a je třeba v co nejkratším čase zjednat nápravu. Možnosti zvýšení účinnosti čištění jsou proveditelné pomocí optimalizací stávajících technologií (časově i finančně nejméně náročné). Přesto nelze zcela omezit fakt, že ČOV nebyly primárně konstruovány na odstraňování reziduí léčiv. Eliminaci lze dále zkvalitnit přidáním dalšího čistícího stupně v ČOV, využívajícího technologie umožňující eliminaci xenobiotik (podmínka vyšších finančních investic, časově náročné schválení nutných legislativních kroků) a v neposlední řadě osvětou široké veřejnosti o způsobech nakládání s nepoužitými léky a omezením velkých zdrojů kontaminace [4,9].

Metody umožňující odstraňování PPCPs a ECDs jsou tvořeny sorpčními a eliminačními procesy. Sorpční mechanismus využívají metody čištění aktivovaným kalem, aktivním uhlím nebo srážením vhodným činidlem. Reakční postup tvoří metody biologického odbourávání, fotodegradace, ozonizace a oxidace. Lze použít i metody nanofiltrace a reverzní osmózy. Novými testovanými postupy odstraňování polutantů z odpadních, povrchových vod a kontaminovaných půd jsou ekonomicky i ekologicky výhodné fytoimediační techniky [10,11].

2.4 Účinky směsí léčiv

Analýzy vzorků vod vždy vedly ke zjištění přítomnosti mnoha léčiv a jejich metabolitů, patřících do značně rozdílných skupin. Ekotoxikologická hodnocení vyjadřující rizika léků pro životní prostředí jsou k dispozici většinou pro jednotlivé léčivé látky. Tato hodnocení pro směsi jsou značně omezená z důvodu nedostatku experimentálních dat, přesto směřují k závěru, že jejich kombinované účinky se značně liší od samostatných forem. V literatuře jsou uváděny případy, kdy vzájemné působení vedlo k aditivním účinkům a nižší koncentrace, než se dalo předpokládat, zapříčinily toxické účinky [11].

Například během testování účinku směsi ibuprofenu s diklofenakem na *Daphnia magna* byla zjištěna vyšší toxicita, než se předpokládalo. Při přidání dalších dvou NSPZL (naproxen a kyselina salicylová), vzniklá směs působila značně toxicky na dafnie, přestože jednotlivé látky byly obsaženy v koncentracích, při kterých samostatně nevykazovaly toxické působení.

Směs 36 µg/l fluoxetinu a 100 µg/l kyseliny klofibrové, působící na *D. magna* vyvolala signifikantní mortalitu a malformace, přestože se neprojeví žádné zřejmé účinky přítomných jednotlivých substancí.

Vystavení láčkovce *Hydra attenuata* směsi jedenácti léků, patřících do odlišných lékových skupin, v koncentracích vyskytujících se v životním prostředí (µg/l-ng/l), vedlo k subletálním účinkům.

Vystavení střevlí během životního cyklu působení šesti léků v řádu ng/l, se nijak neprojevilo na jejich přežití, růstu, či produkci jiker, přesto však byly pozorovány deformace u jejich potomstva [3].

2.5 Fytoremediační techniky

Název je tvořen spojením dvou slov a to: řeckého *phyton* = rostlina a latinského *remedium* = náprava, odstranění [12]. Řadí se do nově zaváděných sanačních metod, s nutností dalšího experimentálního vývoje. Princip spočívá ve využití přirozených schopností rostlin, tzv. přirozené atenuace (MNA), k akumulaci, přesunu, stabilizaci, degradaci nebo odstranění kontaminantů ze zamořených půd, kalů, sedimentů, podzemních, povrchových i odpadních vod [13]. Nově se zkoumá i použití k čištění vzduchu.

Fytoremediacemi lze eliminovat anorganické i organické polutanty. Lze ji použít k sanaci silně i slabě zamořených oblastí, k dočištění po použití jiných postupů a rovněž ke stabilizaci dané oblasti před vodní a větrnou erozí, způsobující další šíření. Atenuace nespočívá pouze ve schopnostech zelených rostlin, ale v celkovém soužití s ostatními mikroorganismy žijícími v půdním prostředí. Produkci allelochemikálií rostliny brání růstu konkurenčních organismů, čímž ovlivňují výskyt mnoha rhizosférických mikrobiálních druhů, stejně jako produkci živin nebo inhibitorů různých bakteriálních drah.

Aby bylo dosaženo maximálního požadovaného efektu je třeba zvolit nejen vhodný druh rostlin, na základě odolnosti vůči vysokým koncentracím kontaminantů, velké produkce biomasy, dostatečného kořenového systému, adaptace na klimatické podmínky, možnosti invaze rostlin do okolí, náchylnosti k chorobám, nárokům na výživu a závlahu, ale i použít odpovídající agronomické techniky [5].

2.5.1 Fytoremediace organických látek

Fytoremediační proces organických látek je umožněn několika procesy. Mohou být metabolizovány přímo mikroorganismy žijícími v kořenovém systému, nebo samotnými rostlinami [5,13].

Při transformaci v rostlinách musí nejprve dojít k sorpci na kořeny, transportu skrz membrány a kumulaci v kořenových buňkách, což je dáno nejen schopností rostliny, ale i fyzikálně-chemickými vlastnostmi látky, typem půdy a stářím kontaminace, tzv. biologickou dostupností. Z kořenů jsou organické látky xylémem transportovány do listů, kde jsou metabolismem probíhajícím ve třech krocích přeměněny na nefytotoxické metabolity. První dva kroky (transformační a konjugací fáze) probíhají

podobně jako u živočichů, třetí vylučovací fáze je u rostlin nahrazena uložením rozpustných metabolitů do vakuol, nerozpustných do buněčné stěny a těkavých vydýcháním do okolí [5].

Sledováním metabolismu organických látek bylo zjištěno, že se na degradaci nejvíce podílejí dehalogenasy, nitroreduktasy, peroxidasy, laktasy, nitrilasy, mono- a dioxygenasy a karboxylesterasy [13].

2.5.2 Fytoremediace těžkých kovů

Zahrnuje sled dějů značně jednodušších než u organických látek. Rostliny přijímají kovy z půdy v podobě hydratovaných iontů nebo vázané v komplexech chelátů, kdy k uvolňování chelatačních činidel do půdy dochází z kořenů rostlin. Z kořenů pak mohou být kovy transportovány přes symplast do xylému, dopraveny do listů a přednostně uloženy v trichomech nebo přímo ve vakuolách kořenových buněk. Speciální typ eliminace je u iontů rtuti, kdy dochází k převedení na těkavou formu a expiraci rostlinnými průduchy. Rostliny snadněji přijímají těžké kovy z důvodu jejich využití jako analogů nutrientů při produkci vlastní biomasy. I přes vysokou odolnost rostlin veškeré přijaté ionty kovů jsou finálně navázány do komplexů, čímž se snižuje jejich toxicita [13,14].

2.5.3 Hyperakumulátory a transgenní rostliny

Hyperakumulátory je označení používané pro rostliny s výraznou schopností akumulace polutantů, až 100x více než jiné druhy bez této schopnosti, oproti koncentraci vyskytující se v okolí. Jsou tvořeny značně širokou taxonomickou skupinou, ale nevyskytují se v oblastech, které byly během poslední doby ledové pokryty ledem. Značnou nevýhodou ztěžující, až zamezující vyžití hyperakumulátorů ve fytoremediačních metodách je jejich značně pomalý růst a schopnost výrazné kumulace pouze určitého prvku. Tím nesplňují nároky kladené na technologicky použitelné rostlinné druhy. Jeden z nejvýznamnějších hyperakumulátorů těžkých kovů je například rostlina *Thlaspi caerulescens* (*Brassicaceae*) [5].

Možnost jak zvýšit účinnost fytoimediačních metod nabízí šlechtění nebo genové manipulace hyperakumulačních rostlin a vytvoření rostlinných druhů přesně odpovídajícím technologickým požadavkům. Největší snahy jsou o co největší produkci biomasy v co nejkratším čase, o zvýšení absorpce kontaminantů a akumulací ve sklíditelných částech rostlin [13].

2.5.4 Rozdělení fytoimediačních technik

Rozdělení se provádí na základě charakteru znečištěného prostředí, typu a koncentraci kontaminantů.

2.5.4.1 Fytoextrakce (fytoakumulace)

Je založená na akumulační schopnosti rostlin. Rostlina zachytí kontaminanty z prostředí pomocí kořenového systému, vyextrahuje je kořeny a transportuje do nadzemních částí rostlin, kde dojde k jejich uložení. Těla rostlin jsou následně sklizena a zlikvidována jako odpad (tepelně, mikrobiálně, chemicky). Metodu lze využít pro sanaci půdy i vody od iontů těžkých kovů (Pb, Cd, Zn, Ni, Cu,...), radionuklidů, nekovů, léčiv i organických látek. Stejně jako u fytodegradací je třeba důkladně prověřit, zda v rostlině nedochází k jejich přeměně na toxičtější látky než byly v původní formě [5,13,15].

2.5.4.2 Fytodegradace

Proces při němž dochází k transformaci polutantů v těle rostliny nebo v rhizosféře, případně uvolňování enzymů do půdy. Vytvořené metabolity se zabudovávají do biomasy rostliny nebo, dochází-li k maximální přeměně, se uvolňuje do okolí oxid uhličitý. Proces lze využít především pro organické znečištění (PAH, PCB, TCE, TPH, detergenty, pesticidy, výbušnin a další) [13,16].

2.5.4.3 Fytovolatilizace

Poněkud kontroverzní metoda, při níž dochází k absorpci těkavých organických sloučenin (VOCs) rostlinou. Extrahovaná látka difunduje rostlinou a v důsledku transpirace je uvolněna do atmosféry. Takto mohou být například odstraňovány složky benzínu nebo rtuť. Jde tedy jen o převedení do jiného prostředí, množství z těchto procesů je ale zanedbatelné v porovnání s uvolňovaným množstvím z ostatních zdrojů. Ve Švédsku bylo testováno i opačné použití, a to schopnost rostlin tvořících městskou zeleň absorbovat složky výfukových plynů, nebo v Japonsku byla studována eliminace oxidů dusíku z ovzduší [5,13].

2.5.4.4 Fytostabilizace

Není založena na transformaci nebo eliminaci kontaminantů, jako ostatní metody, ale na zabránění šíření kontaminace těžkými kovy ze zamořených ploch, s malým pokrytím vegetací, vodní či větrnou erozí. Využívá se jak kořenové zpevnění půdy, tak schopnost kořenů imobilizovat polutanty redukcí, adsorpcí, srážením a vlivem produkovaných huminových látek vážících ionty kovů do nerozpustných forem [13,16].

2.5.4.5 Rhizodegradace

Kořeny rostlin poskytují půdním mikroorganismům vhodné prostředí pro růst, dostatek potravy a stimulují jejich aktivitu. Díky vzájemné symbióze dochází k metabolizaci toxických nebo organických látek speciálními enzymatickými drahami mykorhitických hub a bakterií. Na snižování koncentrací polutantů se podílejí i kořeny samotných rostlin, jednak membránově vázanými enzymy na povrch kořenů, jednak vylučováním enzymů do půdy [5,13].

2.5.4.6 Rhizofiltrace

Proces podobný fytoextrakci, zde však po absorpci není součástí transport polutantů do nadzemních částí rostlin, nýbrž jsou ukládány do vakuol v kořenech. K nejefektivnější filtraci dochází rostlinami s rychle rostoucím kořenovým systémem. Použití je možné u povrchových, odpadních nebo odčerpaných podzemních vod, především u velkých objemů vod s nízkými koncentracemi organických i anorganických látek. Mechanismus odstraňování je velice různorodý a je silně ovlivněn fyzikálně-chemickými vlastnostmi kontaminantů. Velkou výhodou této metody je absence nebezpečí šíření kontaminace vlivem případné konzumace nadzemních částí rostlin živočišnými druhy [5].

2.5.5 Výhody a nevýhody fytořemediace

Aplikace fytořemediací využívající rostliny má řadu výhod, například vyžadují minimální požadavky na lidský zásah, potřebná energie je získávána ze solárních zdrojů, při *in situ* aplikacích není třeba transportu kontaminované půdy, eliminace polutantů probíhá rychleji, než pouze přírodní atenuací, lze je volně sloučit i s ostatními sanačními metodami a v neposlední řadě, zelené plochy jsou mnohem lépe vnímány veřejností než pustá krajina.

Mezi nevýhody limitující použití fytořemediačních metod především patří značná časová náročnost, omezená tvorba biomasy, se kterou po sklizni musí být nakládáno jako s nebezpečným odpadem, hrozba kontaminace potravního řetězce, nedostatek rostlin s odpovídajícími vlastnostmi. Kontaminanty se často vyskytují mimo dosah kořenů rostlin nebo v biologicky nedostupných formách. Značné náklady musí být vynaloženy na monitoring odstraněného množství polutantů a zjištění, nedochází-li k tvorbě toxičtějších metabolitů než byla látka v původní formě. Nedostatečná je i právní legislativa fytořemediačních metod [13, 16].

2.6 Nesteroidní protizánětlivé látky (NSPZL)

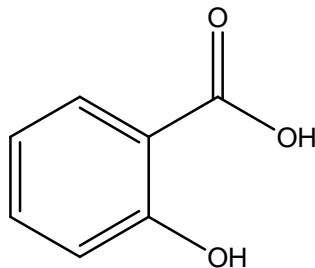
Tyto sloučeniny jsou někdy též označovány jako analgetika-antipyretika a společně s analgetiky-anodynami (opoidními analgetiky) tvoří skupinu látek tišících bolest. Společnou vlastností těchto látek jsou účinky analgetické, antipyretické, protizánětlivé nebo antirevmatické [17]. Mechanismem účinku těchto látek je inhibice enzymů cyklooxygenas (COX-1 a COX-2) a tím tvorby metabolitů kyseliny arachidonové (prostaglandinů) [18]. Ty způsobují nejen senzitivizaci receptorů na mediátory bolestivých podnětů, což vede ke snížení prahu vnímání bolesti, ale také pomocí cAMP v hypothalamu ovlivňují regulaci tělesné teploty. Antipyretické vlastnosti NSPZL snižují teplotu zvýšenou vlivem exogenně podaných prostaglandinů nebo stavů charakterizovaných zvýšenou teplotou. Jsou tedy léky pouze symptomatickými [17]. Jednotlivé NSPZL se vzájemně liší v inhibici cyklooxygenas, což má za následek různé projevy účinků. Většina látek inhibuje COX reverzibilně a to tak, že proniknou do póru enzymu, čímž zabrání navázání kyseliny arachidonové na vazebné místo. Výjimkou je kyselina acetylsalicylová, která způsobuje acetylaci enzymů a jeho ireverzibilní inhibici [18].

I přes podobné účinky nelze všechny NSPZL použít k léčbě všech příznaků, např. z důvodů vysoké toxicity nebo nevhodnosti dlouhodobého podávání. Nežádoucí účinky vyskytující se u NSPZL jsou gastroduodenální vředy, inhibice funkce krevních destiček, vznik hyperkalémie, retence solí, snížení krevního průtoku ledvinami a glomerulární filtrace, až po akutní selhání ledvin u jedinců zneužívajících směsi analgetik. Oproti opoidovým analgetikům mají slabé až středně silné analgetické účinky, ovšem bez nežádoucích účinků na CNS. Ve snaze o zmírnění nežádoucích účinků byly vyvinuty selektivní inhibitory, inhibující pouze COX-2 čímž snižují porušování sliznic [19].

NSPZL by měly být používány jako monoterapie, případně v kombinaci se slabě účinnou opoidní látkou pro zvýšení účinnosti. Směsi kombinující více účinných látek z této skupiny nevedou ke zvýšení požadovaného účinku, ale častěji k většímu množství nežádoucích účinků. Při současném užití s jinými léky je třeba obezřetnosti z důvodu jejich vytěsnění NSPZL z vazby na plazmatické proteiny, mající za následek zvýšení jejich plazmatické koncentrace do oblasti toxických účinků [18].

2.6.1 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová (kyselina o-hydroxybenzoová), Obr. 2.6.1.1, tvoří základní chemickou strukturu všech salicylátů. Název je odvozen od latinského názvu pro vrbu = *Salix*, v jejíž kůře byl glykosid salicylan poprvé objeven [20].



Obr. 2.6.1.1 Kyselina salicylová, kyselina o-hydroxybenzoová.

Kyselina salicylová se aplikuje místně, pro svoje keratolytické (koncentrace účinné látky > 2 %), keratoplastické (< 2 %) a desinfekční účinky, při perorálním podávání je velice špatně snášena (dráždí žaludeční sliznici a vyvolává krvácení). Z tohoto důvodu je nahrazována kyselinou acetylsalicylovou. Její mnohaleté využití je především díky jejím analgeticko-antipyretickým a protizánětlivým účinkům, které jsou považovány za standard pro porovnávání s ostatních NSPZL [17,20].

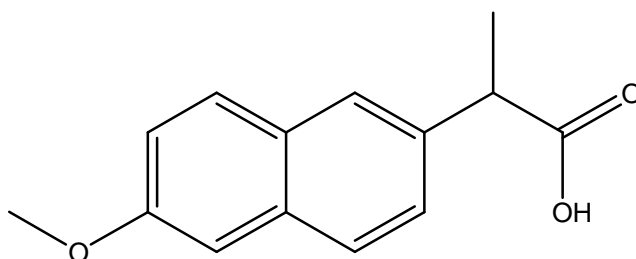
K absorpci salicylátů dochází v žaludku a tenkém střevě, kdy k dosažení terapeutické hladiny postačuje doba kolem 30ti minut. Maximální plazmatické koncentrace je dosaženo po 2 hodinách. Distribuční objem pohybující se kolem 170 ml/kg je díky vazbě na plazmatické proteiny, převážně na albumin, ovlivněn podaným množstvím. Biotransformace kyseliny salicylové probíhá v játrech, a to pomocí konjugace s glycinem za vzniku kys. salicylmočové (70-75 %), s kyselinou glukuronovou na. glukuronid (10-15 %) a hydroxylací vzniká metabolicky aktivní kyselina gentisová (< 1 %). K eliminaci slouží především ledviny, kdy je kyselina salicylová močí odstraňována ve formě metabolitů a do 10 % v nezměněné formě. Biologický poločas rozpadu má hodnotu 2,5-8,5 h a závisí na pH moči a velikosti podané dávky (při vysokých dávkách se hodnota může zvýšit na 16-18 h). Kyselé pH moči má za následek zpětnou tubulární absorpci salicylátů [17,21,22].

Přestože je kyselina salicylová inhibitorem syntézy prostaglandinů postrádá acetylační schopnost a tím nevykazuje nežádoucí účinky na erythrocyty jako její nejvýznamnější derivát kyselina acetylsalicylová. Ostatní vlastnosti ale mají obě látky velice podobné, neboť během 15 minut po podání kyseliny acetylsalicylové dochází

k její hydrolýze na kyselinu salicylovou. Vyskytujícími se nežádoucími účinky jsou přecitlivělost až stav připomínající anafylaktický šok, zvonění v uších (tinitus), zvracení, horečka, hyperventilace, respirační alkalóza, metabolická acidóza, u dětí vznik Reyeova syndromu [17,23].

2.6.2 Naproxen

Jedná se o derivát kyseliny propionové, se systematickým názvem: 2-(6-methoxynaftalen-2-yl)propanová kyselina (Obr. 2.6.2.1). Tento neselektivní inhibitor cyklooxygenas je pro výrazné analgetické, antirevmatické a antipyretické účinky využíván pro akutní i chronickou léčbu [4,17].



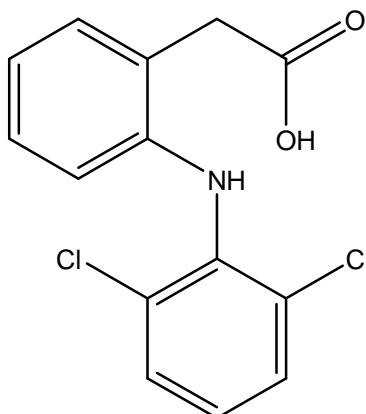
Obr. 2.6.2.1 Naproxen, kyselina 2-(6-methoxynaftalen-2-yl)propanová.

Perorálně podávaná sodná sůl naproxenu se velice dobře absorbuje z GIT a maximální plazmatické koncentrace dosahuje po 1-2 hodinách, samotný naproxen až po 2-4 h. Prodloužení doby vstřebávání je dáno obsahem potravy v žaludku, ale nevede k ovlivnění vstřebaného množství. Koncentrace naproxenu v krevní plazmě lineárně roste s dávkou, až do hodnoty 500 mg, následná stagnace je v důsledku zvýšené renální clearance. Terapeutické koncentrace v rozsahu 23-49 µg/ml se obvykle dosahuje po 4-5 dávkách. Maximální denní dávka nesmí přesáhnout 1650 mg naproxenu. Distribuční objem nabývá hodnot 900 ml/kg. Vazba na plazmatický albumin probíhá do koncentrace 50 µg/ml téměř z 99 %, následně dochází k zvyšování volného naproxenu v plazmě. Naproxen je metabolizován vazbou na kyselinu glukuronovou za vzniku naproxen-glukuronidu (60 %) a přeměna na neúčinný 6-demethylnaproxen (30 %) a konjugáty. Eliminace účinné látky probíhá až z 10 % původní formě močí (95 %) a stolicí (5 %). Poločas eliminace (výrazně delší než u ostatních NSPZL) nabývá hodnot 12-15 h a nezávisí na koncentraci léčiva v krevní plazmě, ani na podané dávce [24].

Přestože je naproxen mnohem lépe snášen než kyselina acetylsalicylová, mohou se při jeho užívání vyskytnout závažné nežádoucí účinky jako: hypersenzitivita, zvracení, vyrážky, točení hlavy, ospalost, závratě, krvácení v GIT, poruchy ledvin, snížená krevní srážlivost. Naproxen je kontraindikován v průběhu těhotenství a kojení, z důvodu prostupu látky přes placentu i do mateřského mléka. Další kontraindikací jsou děti a mladiství do 12-ti let věku [4,24].

2.6.3 Diklofenak

Je derivát kyseliny fenyloctové, se systematickým názvem kyselina {2-[(2,6-dichlorofenyl)amino]fenyl}octová (Obr. 2.6.3.1). Diklofenak je mnohem účinnější než kyselina acetylsalicylová, což je způsobeno rozšířeným mechanismem účinku (neselektivní inhibice cyklooxygenas a snižování hladiny kyseliny arachidonové v leukocytech). Přestože má analgeticko-antipyretické vlastnosti, je především využíván v symptomatické antirevmatické léčbě [17].



Obr. 2.6.3.1 Diklofenak, kyselina {2-[(2,6-dichlorofenyl)amino]fenyl}octová.

Rychlá resorpce diklofenaku z GIT zajišťuje maximální plazmatickou koncentraci do 2-3 h, přičemž je až z 99 % vázáno na plazmatické proteiny. Metabolismus diklofenaku je velice rychlý, již při prvním průchodu játry je látka rozložena téměř z 50 %, vznikající metabolity jsou tvořeny jednorázovou i mnohočetnou hydroxylací a následnou vazbou na kyselinu glukuronovou. Diklofenak a jeho metabolity (4'-hydroxydiklofenak, 5-hydroxydiklofenak, 3'-hydroxydiklofenak, 4',5-dihydroxydiklofenak) jsou vylučovány především močí, část se eliminuje žlučí. Kumulace v synoviální tekutině způsobuje delší terapeutický účinek, než by odpovídalo poločasu eliminace který je v rozmezí 1-2 h [17,19,25].

Při léčbě kdy byl použit diklofenak se může vyskytnout více nežádoucích účinků (až ve 12 % případů) než při podání kyseliny acetylsalicylové. Jedná se o účinky vyskytující se u všech látek ze skupiny NSPZL. Jde se především o obtíže GIT, krvácení, bolesti hlavy, závratě, poruchy soustředění, příznaky připomínající alergii, exantémy a vyrážky. Diklofenak je stejně jako ostatní látky ze skupiny NSPZL kontraindikován v těhotenství a v kombinaci s jinými farmaky může vést k zhoršení nežádoucích účinků [17,19].

2.7 Cíl práce

V rámci studia teoretických základů fytoimediační technologie a v návaznosti na výsledky projektu COST 859 je cílem práce pilotní studie fytoextrakce multikomponentních směsí farmak z kultivačního média obohaceného směsí farmak a stádium vzájemného vlivu jednotlivých farmak na fytoextrakční účinnost, konkrétně vliv kyseliny salicylové na fytoextrakci naproxenu a diklofenaku.

Bakalářský projekt zahrnuje:

- 1) Přípravu sterilních in vitro kultur *Brassica napus*, *Helianthus annuus* (dva kultivary), *Zea mays* a *Pisum sativum*.
- 2) Přípravu medií obohacených o naproxen a diklofenak a jejich směsi s kyselinou salicylovou (2 koncentrace).
- 3) Kultivace a odběr vzorků pro všechny zvolené kombinace kontaminantů a srovnávací experimenty s monokomponentní kontaminací naproxenem a diklofenakem
- 4) HPLC/UV analýza obsahu naproxenu a diklofenaku v kultivačních experimentech s využitím metodiky používané v laboratoři.
- 5) Vyhodnocení vlivu kyseliny salicylové na fytoextrakci naproxenu a diklofenaku.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Během řešení zadaného úkolu byly použity tyto chemické látky: diklofenak (lékopisná čistota, Zentiva), sodná sůl naproxenu (99,9% čistota, Sigma), kyselina salicylová (p.a., Lachema ČR), dimethylsulfoxid (kvalita pro tkáňové kultury, Sigma), sacharosa (čistota p.a., Kulich - Hradec Králové), myo-inositol (kvalita pro tkáňové kultury, Sigma), chemikálie pro přípravu kultivačních medií byly v čistotě p.a., demineralizovaná voda (Demiva 3roi., Watek ČR), methanol pro HPLC (Lab-Scan), acetonitril pro HPLC (Lab-Scan), kyselina octová (čistota p.a., Merck), kyselina fosforečná (čistota p.a., Merck), dihydrogenfosforečnan sodný (čistota p.a., Lachema), Savo (Biochemie s.r.o – Bohumín) a ethanol (96 %, denaturován benzínem).

3.2 Přístroje

Analýzy odebraných vzorků byly provedeny na kapalinovém chromatografu INCOS (ČR), tvořeném: vysokotlakým čerpadlem INCOS LPC 5020, autosamplerm INCOS LCS 5040, UV detektorem INCOS LCS 5000 , kolonou se sorbentem Reprosil 100 C-18 (5µm) o rozměru 4,4 x 250 mm. (Watrex). Naměřená data byla vyhodnocena chromatografickým programem Clarity (DataApex) s automatickým přepočtem dle naměřené kalibrační závislosti mezi detekce 0,05 mg/l.

Dalšími použitými přístroji byly: laminární box BHSL (Labox, ČR), kultivační boxy TCH 100 9 (Laboratorní přístroje, Praha), pH-metr (IQ, Scientific instruments, USA), magnetická míchačka IKA-basic (IKA, SRN).

3.3 Rostlinný materiál

Na fytoextrakci uvedených farmak, byla použita semena vyšlechtěných druhů rostlin:

- Slunečnice roční (*Helianthus annuus*) cv. Orasole, cv. Belem, Monsanto
- Peluška jarní (*Pisum sativum*) cv. Andrea, Selgen a.s.
- Řepka olejka (*Brassica napus*) cv. Exocet, cv. Catalina, Monsanto
- Kukuřice setá (*Zea mays*) cv. 070062, Monsanto

3.4 Pracovní postup

3.4.1 Příprava rostlinných kultur

První krok vedl k přípravě sterilních kultivačních baněk o objemu 250 a 500 ml, obsahujících 10-15 ml sterilního MS živného média [26] s přísávkem myo-inositolu (100 mg/l) a sacharosy (30g/l). Hodnota pH byla upravena před sterilizací na 5,8. Semena příslušných kultivarů byla před vysazením na sterilní živné médium sterilizována v 70% roztoku ethanolu, po dobu 30 s a následně 10 min. v 20% roztoku a 20 min. v 10% roztoku Sava (chlornan sodný). Poté byla semena opláchnuta za aseptických podmínek třikrát sterilní destilovanou vodou a v laminárním boxu přenesena do kultivačních baněk za podmínek obvyklé aseptické techniky. Do připravené kultivační Erlenmeyerovy baňky byl, za dodržení zásad práce ve sterilním prostředí, sterilní pinzetou vnesen odpovídající počet povrchově sterilizovaných semen, 4-8 ks (v závislosti na velikosti finálních rostlin). Hrdlo baňky bylo následně opět sterilně uzavřeno. Takto vysázená semena všech zvolených rostlin, byla kultivována v kultivačních boxech se světelným cyklem 12 h/12 h, světlo/tma, za teploty 25 °C, po dobu tří týdnů. Při případném nedostatku média v baňce bylo, při zachování sterility kultivace doplněno, médium stejného složení. Během průběžné kontroly po dobu kultivace docházelo k vyřazování kontaminovaných kultur.

3.4.2 Fytoextrakce

V laminárním boxu bylo za dodržení sterilních podmínek z dostatečně vzrostlé kultury odlito původní médium a bylo nahrazeno médiem stejného složení obsahující definovanou koncentraci studované látky. Ze zásobních roztoků naproxenu rozpuštěného ve vodě nebo diklofenaku a kyseliny salicylové rozpuštěných v DMSO byl odebrán objem potřebný k vytvoření požadované koncentrace a přidán ke sterilnímu médiu o objemu 50 nebo 100 ml. Takto byly vytvořeny roztoky médií obsahujících naproxen o koncentraci 15 a 17 mg/l a jeho směsi s přísávkem 1 mg/l a 5 mg/l kyseliny salicylové nebo diklofenak o koncentraci 10 a 15 mg/l a jeho směsi s 1 mg/l a 5 mg/l kyseliny salicylové. Ihned po přidání média k rostlině byly odebrány 0,4 ml vzorku a použitím techniky HPLC s UV detekcí (podmínky při měření Tab. 3.1) byla určena reálná výchozí koncentrace přidaného farmaka. Následně byly odebírány vzorky v intervalu 24 h, po dobu 4 dnů a podrobovány stejné analýze. V závěrečné fázi

byly rostliny osušeny, zváženy a spolu se zbytky média zamraženy k další analýze.

Tab. 3.1 Separační podmínky pro měření naproxenu, diklofenaku a jejich směsí s kyselinou salicylovou, v 0,4ml odebraných vzorcích kultivačního média [16].

název účinné látky	složení mobilní fáze	průtok mobilní fáze [ml/min]	vlnová délka detekce [nm]
naproxen	ACN:MeOH:1%CH ₃ COOOH (4:2:4, v/v/v)	1	271
diklofenak	Pufr ^a :MeOH (8:2, v/v), pH=3,2	0,8	280

a - složení pufru: pufr (směs 1:1 (v/v) H₃PO₄ (1g/l) a NaH₂PO₄ · 2H₂O (2,08 g/l)

4 Výsledky a diskuse

Fytoremediační technologie představuje jednu z progresivních metod dekontamice ekosystému a je výhodná především pro polutanty, které se v životním prostředí vyskytují v nízkých koncentracích a nemohou tedy nepříznivě ovlivnit růst dekontaminačních species. Přestože byla původně testována a vyvíjena jako metoda k odstranění škodlivých látek z půd, ukazuje se v posledních letech, že může být mimořádně efektivní i k odstranění kontaminace z odpadních vod či vod zpracovaných současnou čistírenskou technologií jako přídatný stupeň pro odstranění zbytkové kontaminace.

V posledních desetiletích rovněž nabývá na významu znečištění životního prostředí produkty spotřební chemie a farmaceutického průmyslu, kdy především reziduální koncentrace biologicky účinných látek farmaceutických přípravků a jejich metabolitů jsou látkami prokazatelně či potenciálně škodlivými především pro endokrinní regulaci vyšších organismů.

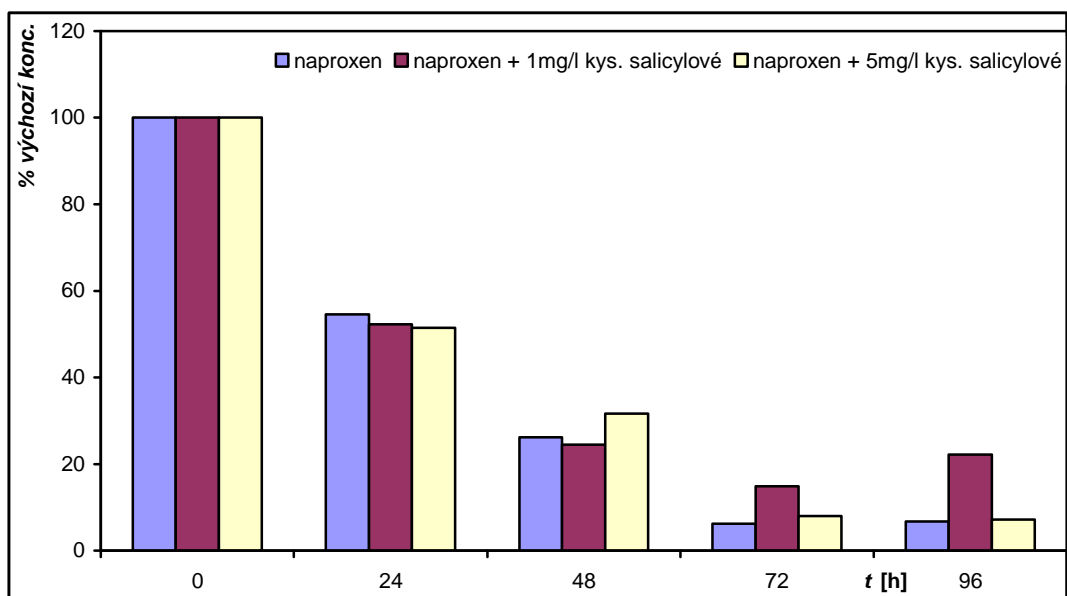
Fytoextrakce a interakce rostlin s organickými sloučeninami je, na rozdíl od iontů těžkých kovů, popsána výrazně méně. Především mechanismus interakce, způsoby přechodu organických sloučenin do kořenového systému a translokace do rostlinných tkání je prakticky neprobádaná. Dokumentované studie popisují především účinnosti fytoextrakčního děje z hlediska praktické použitelnosti. Málokdy však odkrývají osud organických xenobiotik v rostlinách. Navíc jsou studie převážně zaměřeny na fytoextrakce izolovaných substancí. Lze však odůvodněně předpokládat, že v případě multikomponentní kontaminace se budou extrakční účinnosti pro jednotlivé substance lišit. Je proto vhodné studovat změny fytoextrakční účinnosti v multikomponentních směsích. To může přinést informace, jak praktického typu o vlivu matrice na fytoextrakci, tak i teoretické z hlediska nalezení transportních mechanismů mezi kontaminovaným roztokem a kořenovým systémem rostlin. V práci byly studovány změny fytoextrakčního děje v systémech naproxen/kyselina salicylová a diklofenak/kyselina salicylová. Naproxen a diklofenak byly zvoleny jako látky běžně se vyskytující na výstupech z čistíren odpadních vod, vzhledem k jejich velké spotřebě a malé účinnosti čistírenské technologie pro tyto substance, kyselina salicylová potom jako exkretovaný metabolit kyseliny acetylsalicylové, široce využívané jako analgetikum-antipyretikum. Ačkoliv je účinnost čištění pro kyselinu acetylsalicylovou

vysoká, lze předpokládat zbytkové koncentrace i na výpustích z čistíren.

4.1 Naproxen

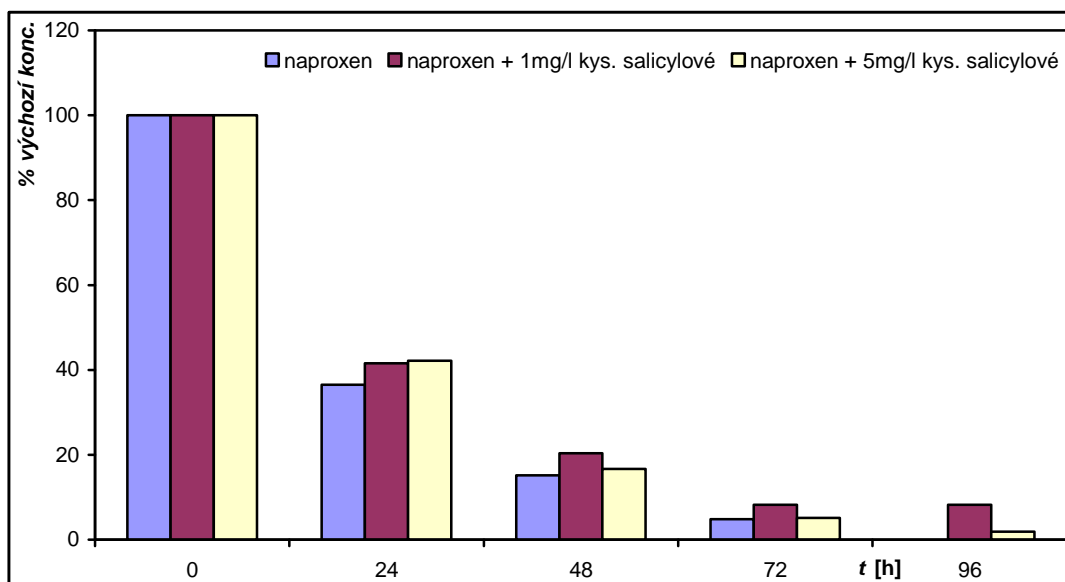
V první fázi byl studován vliv kyseliny salicylové na fytoextrakci naproxenu rostlinami řepky olejky (*Brassica napus* cv. Exocet), peluškou jarní (*Pisum sativum* cv. Andrea) jako rostlinou využívanou pro zelené hnojení a slunečnicí roční (*Helianthus annuus* cv. Orasole).

V případě řepky olejky byly srovnávány fytoextrakce samotného naproxenu s obdobným dějem v systému naproxen/kyselina salicylová, kdy byla zachována vstupní koncentrace naproxenu a modifikována koncentrace kyseliny salicylové. Průběh děje je znázorněn na grafu 4.1.1, kdy jsou hodnoty množství naproxenu v médiu vyjádřeny v procentech jeho vstupní koncentrace. V případě samotného naproxenu klesá jeho množství v médiu s dobou kultivace a po 96 hodinách je pod 10 % vstupní hodnoty. Přídavek kyseliny salicylové zjevně mění kinetiku extrakčního procesu kdy po prvních 24 hodinách se sice dosáhne přibližně stejných výsledků, nicméně v dalších dnech dochází ke zpomalení extrakčního děje. Výrazný rozdíl byl zaznamenán při kombinaci naproxenu s kyselinou salicylovou o koncentraci 1 mg/l, kdy na výstupu z experimentu byl zaznamenán rozdíl kolem 10 % v neprospěch fytoextrakce naproxenu. Ve srovnání s tím je zajímavým výsledkem, že vyšší koncentrace kyseliny salicylové neměla až tak dramatický vliv a i přes pozorovatelnou negativní odchylku účinnosti procesu po 48 a 72 hodinách, byl po 96 hodinách extrakce výsledek srovnatelný s extrakcí samotné testované substance.



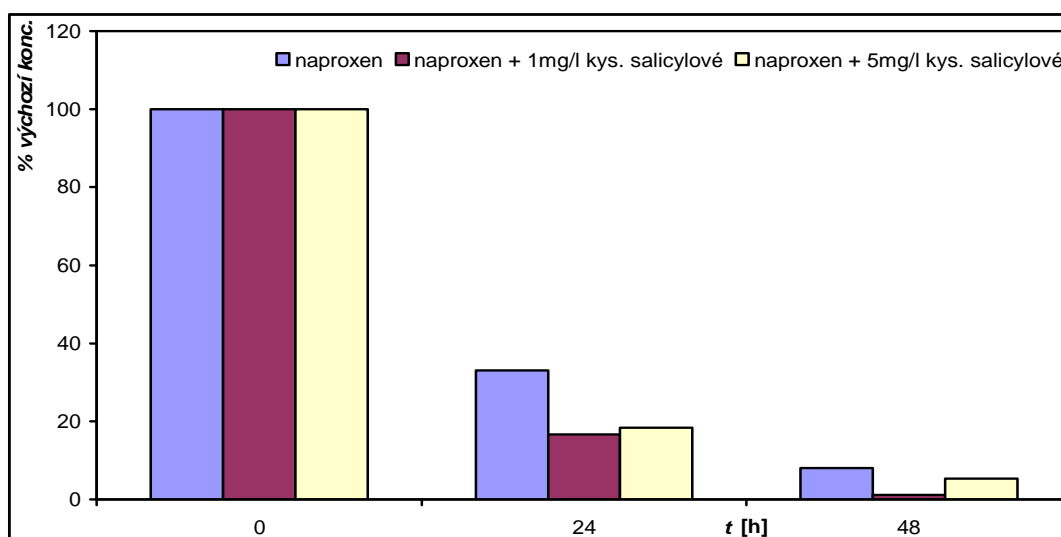
Graf 4.1.1 Pokles koncentrace naproxenu (15 mg/l) s časem při fytoextrakčním experimentu s přidavky kyseliny salicylové. Použitá rostlina: Řepka olejka (*Brassica napus*) cv. Exocet. (použity průměrné hodnoty z 6 kultivací)

V případě pelušky jarní (Graf 4.1.2) byl rovněž pozorován negativní vliv přidavku kyseliny salicylové a po 96 hodinách, kdy v základním experimentu se samotným naproxenem byla jeho koncentrace pod detekčním limitem, byly odchylky ve směsném experimentu do 10 % vstupní koncentrace.



Graf 4.1.2 Pokles koncentrace naproxenu (17 mg/l) s časem při fytoextrakčním experimentu s přidavky kyseliny salicylové. Použitá rostlina: Peluška jarní (*Pisum sativum*) cv. Andrea. (použity průměrné hodnoty z 3 kultivací). Hodnota pro samotný naproxen po 96 hodinách byla pod detekčním limitem.

V grafu 4.1.3 je znázorněn průběh fytoextrakce slunečnicí roční, která v základním monokomponentním systému vykazuje výrazně rychlejší extrakci než předchozí testované rostliny. Po 72 hodinách již nebyly při HPLC analýze nalezeny signály naproxenu a hodnoty po 24 a 48 hodinách ukazují, na pozitivní vliv kyseliny salicylové na úbytek naproxenu v kultivačním médiu, přičemž vyšší pozitivní efekt měla koncentrace 1 mg/l.

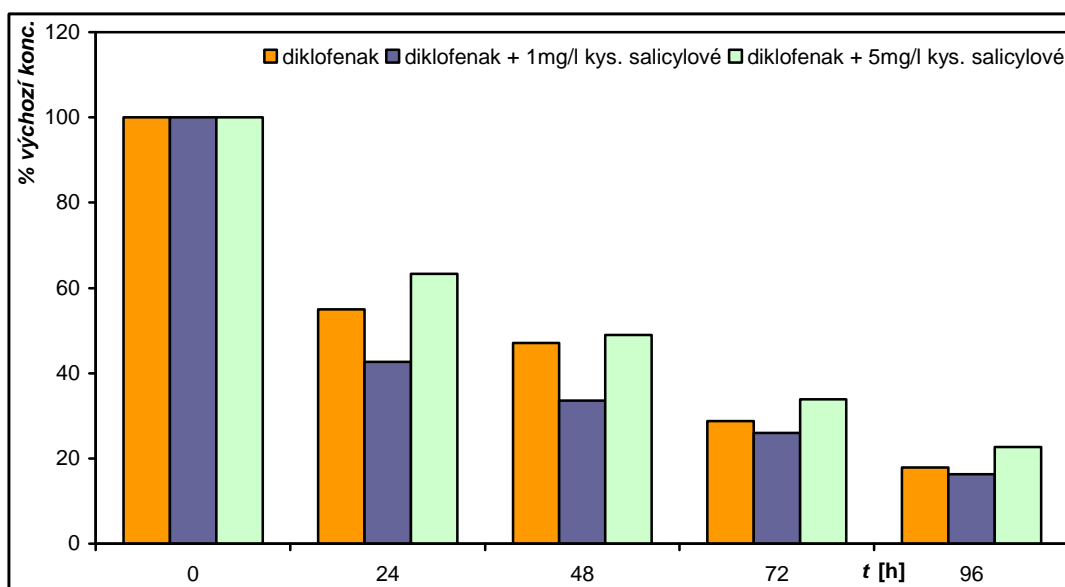


Graf 4.1.3 Pokles koncentrace naproxenu (15 mg/l) s časem při fytoextrakčním experimentu s přidávkou kyseliny salicylové. Použitá rostlina: Slunečnice roční (*Helianthus annuus*) cv. Orasole. (použity průměrné hodnoty z 5 kultivací)

Získané výsledky pro systém naproxen/kyselina salicylová zjevně ukazují, že průběh extrakce je závislý na použitém rostlinném druhu, kdy se mění i smysl vlivu přidané kyseliny salicylové z negativního na pozitivní. Výsledek není až tak překvapivý, protože samotná fytoextrakce je superpozicí adsorpčních, absorpčních, transportních, metabolických a fyziologických dějů, kdy převaha některého nebo některých z nich může výrazně měnit dynamiku procesu. I když v orientačních experimentech nevykazovaly použité rostlinné druhy vizuální poruchy růstu při aplikovaných koncentracích kyseliny salicylové, je možné, že v případě citlivějších a méně robustních rostlin docházelo k odumření části kořenového systému a následně ke zpětnému uvolnění testované substance do media, která byla následně interpretována jako zbytková koncentrace naproxenu. Vzhledem ke složitosti děje je rovněž možné, že v multikomponentních systémech dochází ke kompetici extrahovaných substancí, která je závislá na použitém rostlinném druhu a charakteru či koncentraci kontaminantu.

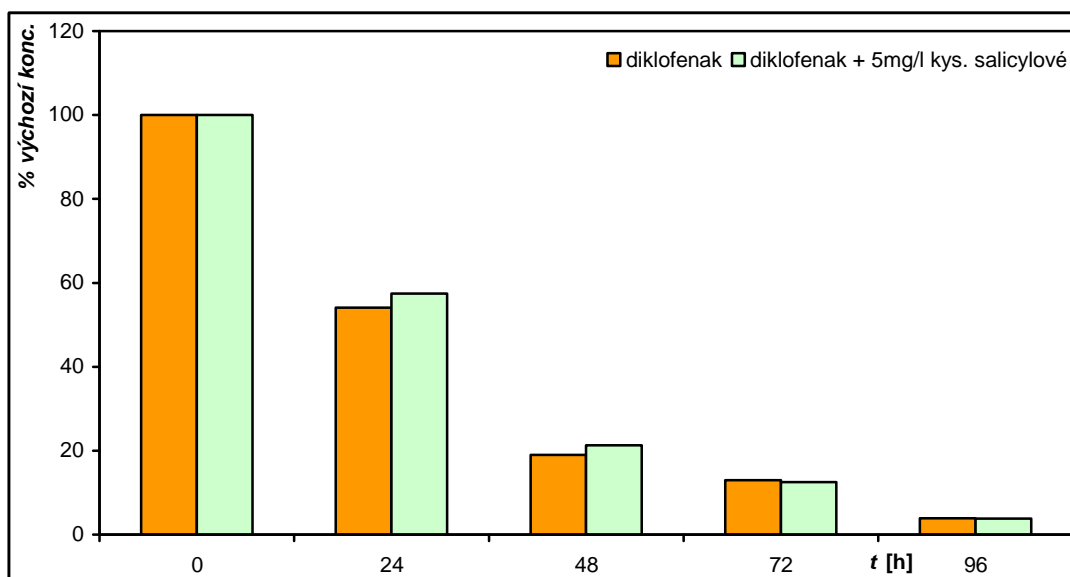
4.2 Diklofenak

V případě studia systému diklofenak/kyselina salicylová došlo rovněž k ovlivnění fytoextrakce studovaného diklofenaku. Při srovnání fytoextrakce samotného diklofenaku a diklofenaku ve směsi s kyselinou salicylovou o koncentraci 1 a 5 mg/l (Graf 4.2.1) dochází k výrazným změnám ve fytoextrakční účinnosti a to tak, že kyselina salicylová o koncentraci 1 mg/l zvyšuje fytoextrakční účinnost v celém testovaném intervalu 96 hodin, zatímco koncentrace 5 mg/l extrakci snižuje. Tento fakt vypovídá o možnosti nepříznivého vlivu na viabilitu kořenového systému, při této koncentraci kyseliny salicylové.



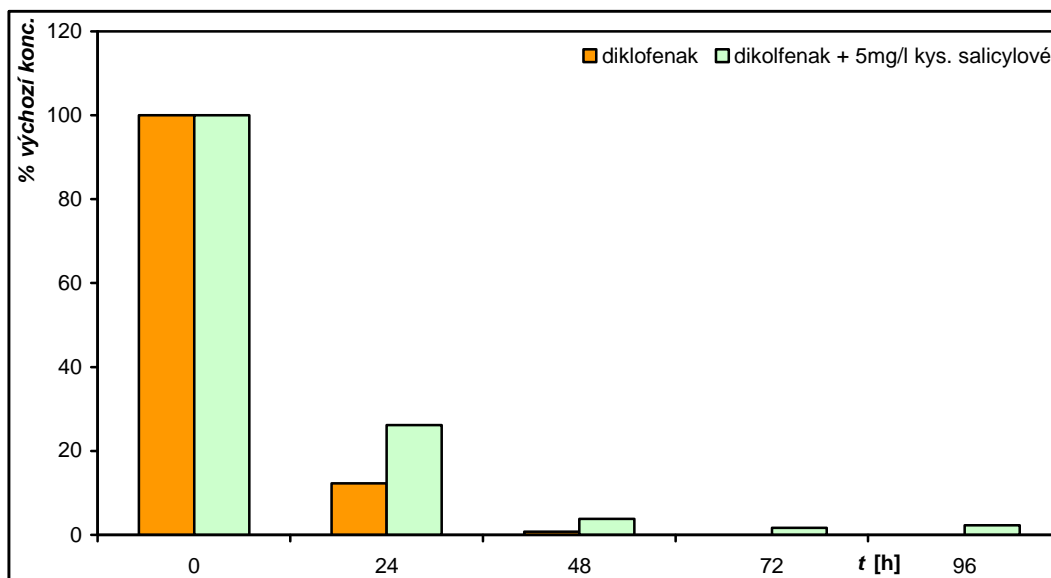
Graf 4.2.1 Pokles koncentrace diklofenaku (10 mg/l) s časem při fytoextrakčním experimentu s přidávkou kyseliny salicylové. Použitá rostlina: Slunečnice roční (*Helianthus annuus*) cv. Orasole. (použity průměrné hodnoty z 5 kultivací)

Pro srovnání byl použit jiný kultivar slunečnice roční s robustnějším kořenovým systémem a srovnávána byla extrakce samotného diklofenaku a diklofenaku s přidávkou kyseliny salicylové (Graf 4.2.2). Výsledky potvrzují předchozí domněnku o viabilitě kořenového systému, neboť rostlina s robustnějším kořenovým systémem sice vykazuje do 48 hodin kultivace nižší fytoextrakční efekt, nicméně v následujících intervalech 72 a 96 hodin je účinnost prakticky stejná. Rozdíly mezi extrakcí z monokomponentního a dikomponentního roztoku jsou i v prvních dvou měřeních o něco menší než v případě prvního testovaného kultivaru.



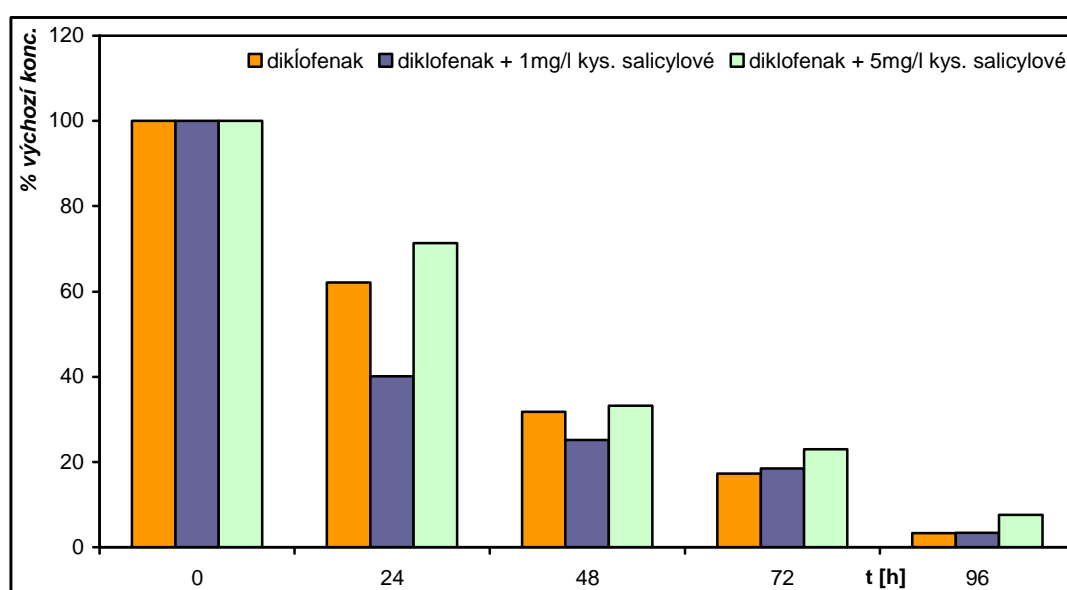
Graf 4.2.2 Pokles koncentrace diklofenaku (15 mg/l) s časem při fytoextrakčním experimentu s přidavky kyseliny salicylové. Použitá rostlina: Slunečnice roční (*Helianthus annuus*) cv. Belem. (použity průměrné hodnoty z 3 kultivací)

V případě kukuřice (Graf 4.2.3) kdy extrakce samotného diklofenaku je extrémně rychlá a po 72 hodinách již nelze použitou metodou detegovat studovanou látku, byl prokázán výrazný negativní vliv kyseliny salicylové na fytoextrakci diklofenaku a ani po 96 hodinách neklesla jeho koncentrace pod detekční limit použité HPLC/UV metody.



Graf 4.2.3 Pokles koncentrace diklofenaku (15 mg/l) s časem při fytoextrakčním experimentu s přidavky kyseliny salicylové. Použitá rostlina: Kukuřice setá (*Zea mays*) cv. 070062 (použity průměrné hodnoty z 3 kultivací)

V grafu 4.2.4 je znázorněn průběh kultivačních experimentů se samotným diklofenakem a diklofenakem ve směsi s kyselinou salicylovou o koncentracích stejných jako v předchozích experimentech. Kyselina salicylová o koncentraci 1 mg/l ve směsi s diklofenakem zvyšuje v prvních dvou dnech kultivace fytoextrakční účinnost a zbytkové koncentrace jsou menší než u extrakce samotného diklofenaku, vyšší koncentrace, 5 mg/l extrakci snižuje. Tento fakt rovněž napovídá o toxickém působení vyšších koncentrací na kořenovou tkáň či metabolismus použitého rostlinného druhu.



Graf 4.2.4 Pokles koncentrace diklofenaku (15 mg/l) s časem při fytoextrakčním experimentu s přidavky kyseliny salicylové. Použitá rostlina: Řepka olejka (*Brassica napus*) cv. Catalina. (použity průměrné hodnoty z 5 kultivací)

Extrahovaná množství studovaných látek byla stanovena na základě poklesu koncentrace studované látky v kultivačním mediu a stanovením čerstvé hmotnosti rostliny po ukončení experimentu. V případě naproxenu a řepky olejky bylo extrahováno průměrně 0,16 mg/g čerstvé hmotnosti rostliny, v případě pelušky jarní 0,22 mg/g. Slunečnice dosáhla pro naproxen hodnoty 0,15 mg/g čerstvé hmotnosti. V případě diklofenaku bylo v monokomponentním roztoku extrahováno 0,28 mg/g čerstvé hmotnosti řepky olejky, při přidavku 1 mg/l kyseliny salicylové bylo dosaženo hodnoty 0,31 mg/g čerstvé hmotnosti rostliny. Koncentrace kyseliny salicylové 5 mg/l v souladu s předchozími závěry snížila extrahované množství na 0,15 mg/g rostliny.

5 Závěr

V testovaných systémech naproxen/kyselina salicylová a diklofenak/kyselina salicylová bylo prokázáno, že v multikomponentním systému dochází k vzájemnému ovlivnění extrahovaných komponent jak v negativním, tak i v některých případech pozitivním smyslu. Srovnání dvou kombinací testovaných látek naproxenu a kyseliny salicylové jako dvou kyselin a směsi diklofenaku obsahujícího kromě karboxylové funkce rovněž sekundární amin neukázalo výrazné rozdíly. Zvýšení extrakce diklofenaku ve směsi s kyselinou salicylovou by mohlo poukazovat na protonizaci sekundárního dusíkového atomu a na mechanismus sorpce či transportu ve formě iontové výměny. Efekt však nebyl pozorován obecně a v celkovém shrnutí výsledky ukazují spíše na kompetici dvou sorbovaných látek a vliv kyseliny salicylové na viabilitu vlasečnicového systému kořenů. V případě pozitivních odchylek by rovněž mohlo dojít k aktivaci rostlinného metabolismu vlivem kyseliny salicylové. Výsledky však jednoznačně ukazují na nutnost testovat fytoextrakční děje z hlediska multikomponentní kontaminace a vliv matrice na účinnost záchytu jednotlivých komponent znečištění. Podstatným je i fakt, že vzájemné ovlivnění extrahovaných komponent se liší s použitým rostlinným druhem. Zda je tento efekt pouze otázkou citlivosti kořenového systému vůči kyselině salicylové, či se jedná o záležitost metabolickou je třeba rozhodnout až na základě dalších experimentů.

Soupis bibliografických citací

- [1] Váňa M.; Wanner F.; Matoušová L.; Fuksa J.K.: Možnosti odstraňování vybraných specifických polutantů v ČOV, *VTEI*, **52**:2, 1-3 (2010).
- [2] Snyder S. A.: Occurrence, Treatment, and Toxicological Relevance of EDCs and Pharmaceuticals in Water, *Sci. Eng.*, **30**, 65-69 (2008).
- [3] Santosa Lúcia H.M.L.M.; Araújo A.N.; Penab Adriano Fachini A.; Montenegro C. Delerue-Matosc M.C.B.S.M.: Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment, *J. Hazard. Mater.*, **175**, 45-95 (2010).
- [4] Rozsypal L.: Analýza léčiv v povrchových vodách, Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc (2010). Dostupné z URL: <<http://theses.cz/id/ssai07/>>.[cit. 15.8.2010]
- [5] Macková M.; Macek T.: Využití rostlin k eliminaci xenobiotik z životního prostředí, *Vědecký výbor sanitární a životního prostředí*, **projekt 13** (2004). Dostupné z URL: <<http://www.phytosanitary.org>> [cit. 28.3.2010]
- [6] Kotyza J.; Soudek P.; Kafka Z.; Vaněk T.: Léčiva nový environmentální polutant, *Chem. listy*, **103**, 540-547 (2009).
- [7] Nikolaou A.; Meric S.; Fatta D.: Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments, *Anal Bioanal Chem*, **387**, 1225-1234 (2007).
- [8] Zwiener C.: Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment, *Anal Bioanal Chem*, **387**, 1159-1162 (2007).
- [9] Carballa M.; Omil F.; Lema J. M.: Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment, *Water Res.*, **39**, 4790-4796 (2005).
- [10] Carballaa M.; Omil F.; Lemaa J. M.; Llompert M.; García-Jares C.; Rodríguez I.; Gomez M.; Ternes T.: Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and.hormones in a sewage treatment plant, *Water Res.*, **38**, 2918-2926 (2004).
- [11] Kümmerer K.: The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges, *J. Environl Manage.*, **90**, 2354-2366 (2009).
- [12] Červenková A.: Obsah polutantů v rostlinných materiálech, Bakalářská práce, Univerzita T. Bati, Zlín (2005). Dostupné z URL: <http://is.muni.cz/th/124373/prif_m/Krystofova_Diplomova_Prace.txt> [cit. 28.3.2010].

- [13] Soudek P.; Petrová Š.; Benešová D; Kotyza J.; Vaněk T.: Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti; *Chem. listy*, **102**, 346-352 (2008).
- [14] Tlustoš P.; Habart J.: Využití průmyslových rostlin k remediaci kontaminovaných půd. Dostupné z URL: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky>> [cit. 21.8.2010].
- [15] Badalíková B.; Bartlová J.; Hrubý J.; Hartman I.: Fytoremediační postupy s využitím netradičních rostlin; Výzkumný ústav pícninářský, spol. sro. Troubsko, Zemědělský výzkum, spol. sro. Troubsko, Uplatněná certifikovaná metodika 7/09.
- [16] Šlechtová M.: Využití rostlinných biotechnologií k odstraňování farmak ze životního prostředí, Diplomová práce, UK Praha (2010).
- [17] Hynie S.: *Speciální farmakologie – díl 2, Autakoidy a látky ovlivňující bolest*, Praha, Karolinum 1995, s. 81-113.
- [18] Lüllmann. H, Mohr.K, Ziegler.A, Bieger.D,: *Barevný atlas farmakologie*, GRADA Publishing, Praha 2001, s. 198-203.
- [19] Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*, GRADA Publishing , Praha 2002, s. 337-354.
- [20] Martínková J.; Chládek J.; Mičulda S.; Chládková J.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, Praha, GRADA Publishing 2007, s. 161-174.
- [21] Jabor A.: Kyselina salicylová, *Datový standard MZ ČR*. Dostupné z URL: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/AJAKO.htm> [cit. 12.6.2010].
- [22] Informace pro lékaře SUKL/kyselina acetylsalicylová. Dostupné z URL: <<http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>> [cit. 8.7.2010].
- [23] Jabor A.: Salicyláty, *Datový standard MZ ČR*. Dostupné z URL: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/AJAKP.htm> [cit. 12.6.2010].
- [24] Informace pro lékaře SUKL/naproxen. Dostupné z URL: <<http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>> [cit. 28.6.2010].
- [25] Informace pro lékaře SUKL/diklofenak. Dostupné z URL: <<http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>> [cit. 28.6.2010].
- [26] Murashige, T.; Skoog, F.: *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497 (1962).